

혈중 일산화탄소 헤모글로빈의 분석법에 관하여

박성우 · 최영남 · 이광영 · 김남이 · 김동환

국립과학수사연구소 화학분석과

1. 서 론

일산화탄소(CO)는 분자량이 28.01이고 비중이 공기와 거의 비슷한 무색, 무취의 기체로서 일상생활 주변에 흔히 존재하는 석탄가스, 프로판가스, 부탄가스 등의 연료용 가스, 목재, 석탄, 석유, 가솔린, 등유 등의 연료, 자동차 및 비행기 연료 등의 유기연료(organic fuels)들이 불완전연소할 때 발생하며¹, 담배연기 속에도 약 4% 정도 함유하고 있으며, 자동차 배기가스 속에는 약 0.5~10% 정도를 포함하며, 고속도로 및 담배연기가 가득한 방안의 대기 중 일산화탄소의 농도는 2~50ppm 정도를 나타낸다.²

또한 일산화탄소는 적혈구내 혈색소(hemoglobin)와의 결합력이 산소보다 210배나 높아서 저농도에서도 다량의 일산화탄소 헤모글로빈(CO Hb, carboxyhemoglobin)을 형성하여 산소운반을 저해하므로 내질식(internal asphyxiation)을 초래하기 때문에 여러 가지 병리적, 생리적 변화를 초래하게 된다.³

대기 중 CO 농도와 흡입시간에 따른 신체적 변화 증상은 Fig. 1과 같다.

우리 체내에서 평균 시간당 0.4m³의 일산화탄소 가스를 heme의 이화작용(catabolism)에 의해 배출하고 있으며, 이는 보통 정상인의 경우 CO Hb의 농도가 0.4~0.7% 정도가 됨을 시사한다.⁴

도시에서 살고 있는 비흡연자의 경우 CO Hb 농도는 1~2% 정도이고, 흡연자의 경우는 5~6% 정도가 되며, 대기 중 CO 농도가 50, 100, 200ppm일 때 체내 CO Hb 포화도는 8, 16, 30%가 된다고 하며, 포화도가 12~13% 정도일 때까지는 흡연자나 비흡연자나 모두 어떤 간섭물질과의 상관관계의 정립이 요구되어지고 있으며, 사전현장에서 사용할 수 있는 간편한 chemical

3기압의 산소를 사용할 경우는 약 24분 정도까지 줄일 수 있다.⁴

CO Hb의 농도가 30% 이상이 되면 생명에 위험을 초래하는 것으로 알려져 있으며, 화재사의 경우 그 원인이 연소시 발생되는 CO 가스와 Hydrogen cyanide 가스에 의한 것으로 알려져 있으며, 미국의 경우 화재사한 85명 중 59%가 CO Hb 농도가 25~85% 사이로 나타났으며,⁷ flash fire에 의한 사망자의 경우는 CO Hb 농도가 그렇게 중요한 수치를 나타내지 않았다고 보고했다.⁸

우리나라의 경우 아직도 연탄의 사용이 많으므로 인하여 일산화탄소 중독사고의 발생이 빈번하게 일어나고 있으며, 당 연구소에 감정의뢰된 일산화탄소 중독 사고는 Fig. 2와 같이 89년에 647건, 90년에 499건, 91년에 475건으로 집계되었으며, 월별로는 11~12월이 가장 많았고, 해마다 일산화탄소 중독사고 건수가 줄어들고 있는데, 이는 국내 연탄 소비량의 감소와 더불어 주거환경의 개선 등에 기인하는 것으로 사료되며 감정 건수 중 50% 이상이 CO Hb 농도가 30% 이상을 나타내고 있다.^{9, 25, 26}

혈중 일산화탄소 헤모글로빈의 농도측정은 법화학적으로 일산화탄소 중독에 의한 사망 여부를 판단하는데 중요하므로, 간단하며, 정확하고, 신속한 CO Hb 농도 측정법이 요구되어지며, 또한 Methemoglobin(Met Hb)의 생성 등으로 혈액이 변성되는 등 CO Hb에 대한 정진적 이상증세는 보이지 않는다고 한다.^{5, 6} 정상인의 경우 CO Hb의 반감기(half-life)는 4~5시간 정도이나 산소요법을 이용하면 약 80분 정도로 줄일 수 있으며, sensor의 개발도 요구되고 있다.

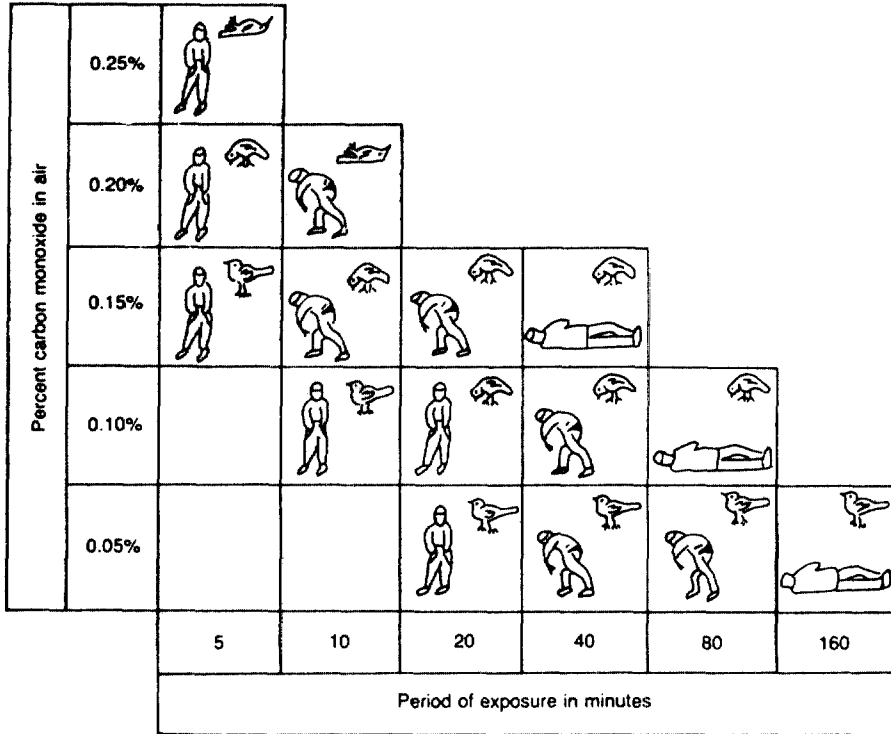


Figure 1. Schematic representation of how the carbon monoxide concentration in the mine air would affect the behavior of the canary or miner. Graphs are approximations of time to toxicity and lethality. (Based on Spencer, T. D. "Effects of Carbon Monoxide on Man and Canaries." *Ann. Occup. Hyg.* 5:1961. Figure 3.)

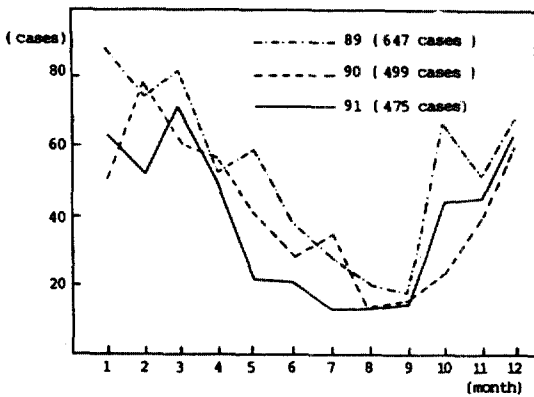


Figure 2. Distribution of death due to carbon monoxide poisoning.

2. 실험

2.1 실험방법

CO Hb 농도 측정을 위한 시료는 일산화탄소 가스를 유리시키거나 헤모글로빈의 변성을 초래할 수 있는 박테리아의 작용을 억제하기 위해서 whole blood에 sodium fluoride를 넣은 후 실험 전까지 4℃의 암실에서 보관한다. CO Hb 농도의 정성 및 정량분석법은 습식법¹⁰, Spectrophotometric method^{11-15,24}, gas chromatographic method^{16-18,24} 등이 소개되어 있으며, 여기서는 습식법과 Spectrophotometry 및 Gas chromatography를 이용한 방법들을 소개하고자 한다.

2.1.1 습식법

○ Wachholz-Lamberger법은 검체 혈액 2cc에 증류수를 넣어 혼합한 액을 2개의 시험관에 10% 페리시안화칼륨시액 5방울씩을 넣고 한쪽 시험관은 2~3회 가만히 전도하여 혼합하고 다른 시험관은 대조용으로서 15분간 강하게 혼돈다. 다음 두 시험관에 (NH₄)₂S 용액 4방울씩을 넣어 섞고 10% 탄닌산시액 4cc씩을 넣고

흔들면 대조용 시험관은 어두운 등갈색의 석출물이 생기고 다른 시험관은 적갈색을 나타낸다.

◦ Salkowski-Hoppe-Seyler 법(NaOH법)은 검체 혈액 및 대조혈액의 각 5% 수용액에 비중 1.34의 진한 NaOH를 같은 용량 섞는다. 이때 일산화탄소헤모글로빈이 들어 있는 검체 혈액은 옅은 홍색의 용액이 되면서 일산화탄소 hematin의 적색 석출물이 액면 위에 떠오른다. 그러나 대조혈액은 약간 녹색을 띤 갈색이 나타날 뿐이다(oxyhematin).

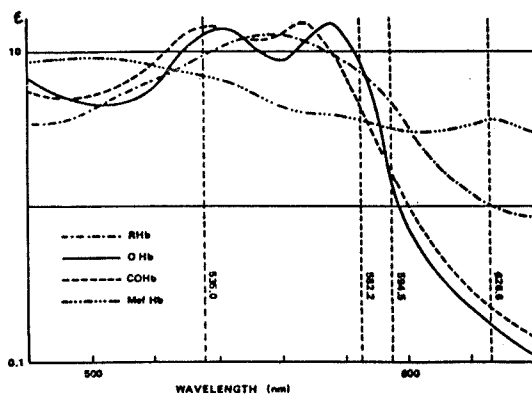
◦ Kunkel(tannic acid법)은 검체 혈액 및 대조혈액의 각 20% 수용액 5cc에 3% 탄닌산 10cc를 넣고 흔들어 섞으면 검체 용액은 홍색을 나타내며 대조용액은 회갈색을 나타낸다.

◦ Pyrotannic법은 검체 혈액 1cc를 증류수 9cc로 희석한 후 1g의 pyrogalllic acid와 1g의 tannic acid를 증류수로 100cc로 만든 pyrotannic acid 용액 10cc를 가한 다음 흔들어 섞은 후 약 15분 후에 검체용액은 분홍색을 띠며, 대조용액은 회갈색을 나타낸다.

2.1.2 CO-oximeter법^{15,19}

혈액 0.3ml를 10% octyl polyethoxyethanol 용액으로 9:1로 희석한 후 CO-oximeter의 cell에 흡입시켜 흡광도를 측정하는 방법으로 Fig. 3, Fig. 4와 같이 535.0nm, 582.2nm, 594.6nm, 626.6nm 의 파장에서 각 R Hb, O₂ Hb, CO Hb, Met Hb의 absorbance value로부터 아래

식에 의하여 각 농도를 상대비로 구하는 분광광도법으로 매우 편리하기는 하나, Met Hb가 약 10% 이상인 혈액에서는 4파장에서 absorbance variation을 일으켜 각 농도에 오차가 생길 수 있으므로 그 정확도가 낮아지며, 또한 lipid particle 등의 존재시 light scattering이



$$C(RHb) = K(\epsilon_{535RHb}A_{535} + \epsilon_{585RHb}A_{585} + \epsilon_{594RHb}A_{594} + \epsilon_{626RHb}A_{626})$$

$$C(O_2Hb) = K(\epsilon_{535O_2Hb}A_{535} + \epsilon_{585O_2Hb}A_{585} + \epsilon_{594O_2Hb}A_{594} + \epsilon_{626O_2Hb}A_{626})$$

$$C(COHb) = K(\epsilon_{535COHb}A_{535} + \epsilon_{585COHb}A_{585} + \epsilon_{594COHb}A_{594} + \epsilon_{626COHb}A_{626})$$

$$C(MetHb) = K(\epsilon_{535MetHb}A_{535} + \epsilon_{585MetHb}A_{585} + \epsilon_{594MetHb}A_{594} + \epsilon_{626MetHb}A_{626})$$

where
C = concentration of each Hb species
K = a scalar constant set by the THb calibration procedure

ϵ = each coefficient in the matrix(4 Hb species at 4 wavelengths)

A = the absorbance value of the blood at each wavelength

The THb value(g/dL) is the sum of the four concentrations:

$$THb = C(RHb) + C(O_2Hb) + C(COHb) + C(MetHb)$$

$$\%O_2Hb = \frac{C(O_2Hb)}{THb} \times 100$$

$$\%COHb = \frac{C(COHb)}{THb} \times 100$$

$$\%MetHb = \frac{C(MetHb)}{THb} \times 100$$

$$\%RHb = 100 - (\%O_2Hb + \%COHb + \%MethHb)$$

.Figure 4. Absorption spectra of hemoglobin

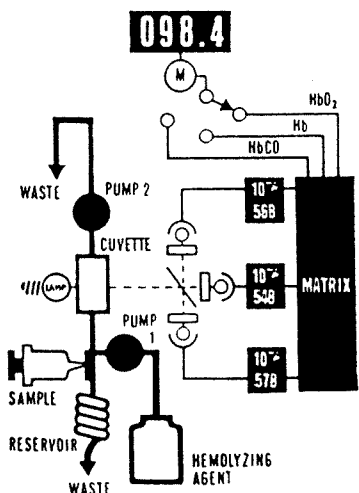


Figure 3. The CO-oximeter. Schematic principle of operation and electronic system.

일어나서 spectrum interference을 일으켜 THb와 Met Hb의 농도가 증가되고, O₂ Hb와 CO Hb의 농도는 감소되는 경우도 있으며, 또한 sulfur 이온 존재시 생성된 sulfhemoglobin은 Met Hb와 유사한 스펙트럼 흡수곡선을 나타내므로 이로 인해 간섭을 받는 등의 단점이 있다.

그런데 당 연구소의 감정시료들은 시간경과 및 그 조건에 따라 Met Hb가 높은 혈액들이 있으므로, 법화학적 감정용으로는 CO-oximeter가 부적합한 면이 있다고 사료된다.

2.1.3 Ultraviolet spectrophotometry법

UV/Vis법에서는 혈액에 환원제인 sodium hydrosulfite(Na₂S₂O₄)를 첨가시킴으로써 CO Hb를 제외한 Met Hb와 O₂ Hb를 R Hb로 환원시켜 Met Hb에 의한 간섭 효과는 배제할 수 있는 장점이⁵ 있으며, 이는 혈액을 암모니아 완충용액으로 hemolysate(용혈산물)로 만든 후 파장 700nm에서 450nm까지의 흡수 스펙트럼을 보면 Figure 5에서 보는 바와 같이 CO gas에 중독되지 않은 신선한 혈액의 경우 577nm와 541nm에서 최고 흡수대를 보이는 반면, sodium hydrosulfite로 환원시킨 후에는 555nm에서 흡수대가 올라감을 볼 수 있으며, 이는 R Hb의 전형적인 스펙트럼곡선이며, CO gas에 중독된 혈액의 경우는 sodium hydrosulfite로 환원시킨 후에 555nm에서 흡수대가 형성되지 않는 CO Hb의 전형적

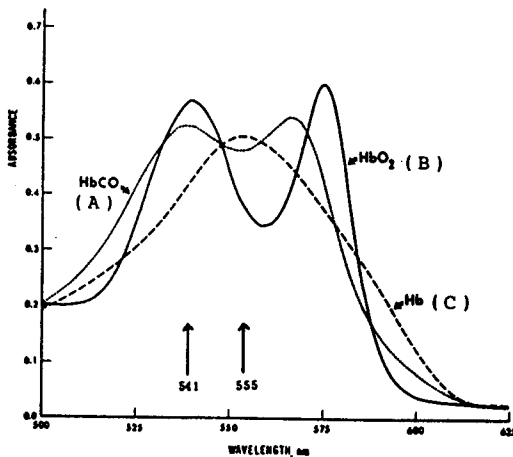


Figure 5. Absorption spectra of equal concentrations of (reduced) hemoglobin, oxyhemoglobin and carboxyhemoglobin in aqueous solution.

인 스펙트럼을 얻을 수 있음으로 인해 CO gas에 의한 중독 여부를 판명할 수 있음과 동시에 정량까지도 가능하였다. 그러나 CO Hb 농도가 낮은, 약 20% 미만인 경우는 Figure 5 (A)와 같은 전형적인 CO Hb 스펙트럼을 얻을 수 없는 단점 등이 있으며, 또한 sulfur ion 존재시 이로 인해 sulfhemoglobin이 생성되어 UV/Vis absorbance에 간섭효과를 일으킬 수 있다.¹⁴ 이는 sulfhemoglobin이 환원제인 sodium hydrosulfite에 의해 R Hb으로 환원되지 않기 때문이다.

2.1.4 Gas chromatography법

혈액에 potassium ferricyanide를 가하여 CO gas를 해리시켜 이로부터 해리된 CO gas를 molecular sieve-흡착 기전에 의해 분리한 다음 thermal conductivity detector를 이용하여 검출하는 방법으로, 증류수로 희석된 혈액(1:1)에 n-octylalcohol 한두 방울과 4v/v% Triton X-100 용액 0.2ml를 가하여 밀봉한 후 potassium ferricyanide 용액 1ml를 첨가하여 실온에서 5분간 혼합한 다음 GC로 분석하였으며, 그 분석조건을 Table 1에, chromatogram은 Figure 6에 나타내었다.

Table 1. gas chromatography condition.

column	: Molecular sieve 5A, 2m×1/8" stainless steel
column temp.	: 75°C(5min) 10°C/min > 120°C(10min)
injector temp.	: 180°C
detector temp.	: 180°C
detector	: TCD
filament current	: 150mA
filament temp.	: 210°C
carrier gas flow	: 15ml/min(He gas)

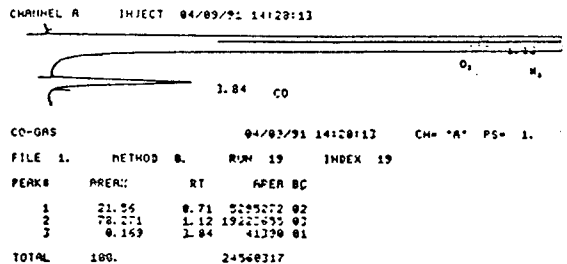


Figure 6. Gas chromatogram of carboxyhemoglobin.

GC법에서는 모든 CO Hb의 결합을 potassium ferricyanide에 의하여 CO gas로 해리시켜 TCD에 의하여 분석함으로써 높은 농도의 Met Hb를 갖고, 낮은 농도의 CO Hb를 함유한 혈액에서도 정확한 CO Hb 농도를 측정할 수 있는 장점이 있다.

2.2 일산화탄소 헤모글로빈에 영향을 주는 요인들

2.2.1 온도

온도가 높을수록 CO gas의 해리율이 높으며, Met Hb의 생성률도 높다. Figure 7에서 보듯이 공기 존재하에서 65℃와 85℃로 5분간 가온했을 때 최대 30%의

CO Hb가 CO gas로 해리함을 보였고 헬륨 존재하에 혈액을 보관한 것은 공기 존재하에서 보관한 것보다 CO gas 해리율이 더 낮았으며, 45℃, 65℃ 가온군의 경우 최대로 20% 정도의 CO gas 해리율을 보였고,²⁰ Met Hb 생성의 경우는 Figure 8, 9, 10, 11에서 보듯이 신선한 혈액보다는 post-mortem blood에서 더 많이 생성되며 또한 온도가 높을수록 더 많이 생성된다. 또한 CO Hb의 농도가 낮을수록 더 많은 Met Hb를 생성한다.¹⁵

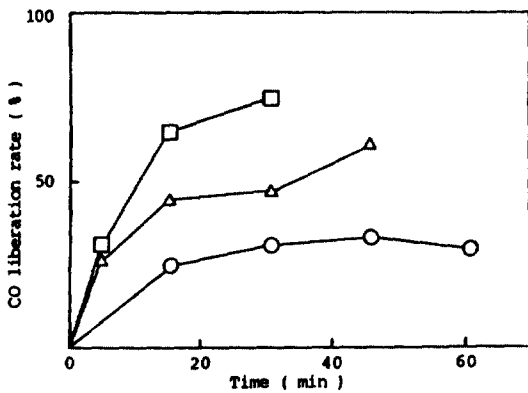


Figure 7. The effect of heating on CO Hb content of the blood in the presence of air in vitro.

○ : 45℃ △ : 65℃ □ : 85℃

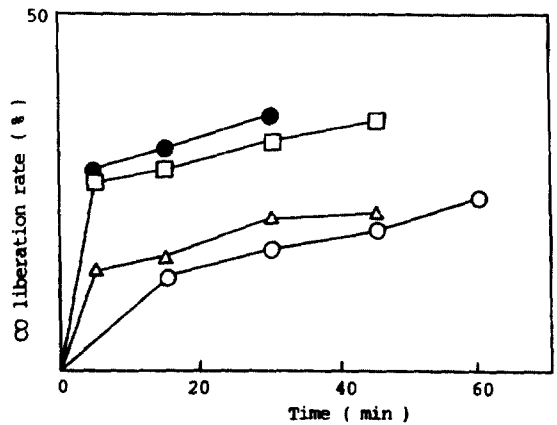


Figure 8. The effect of heating on CO Hb content of the blood in the presence of helium in vitro.

○ : 45℃ △ : 65℃ □ : 85℃ ● : 100℃

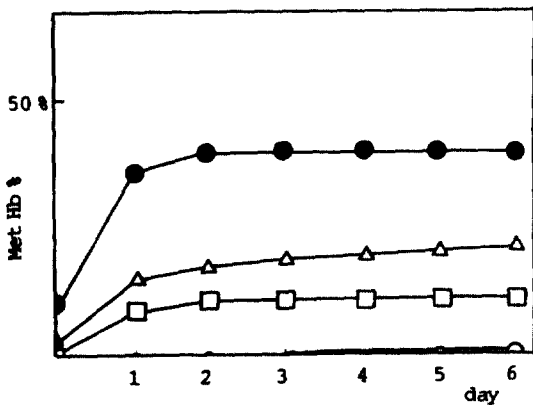


Figure 9. Change of Met Hb% in the blood preserved at -20℃

○ : fresh blood, ●, □, △ : post-mortem blood.

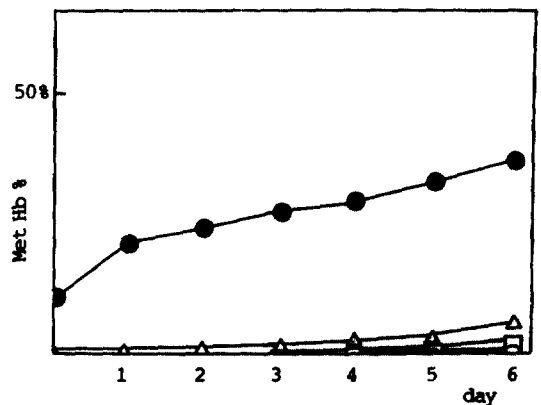


Figure 10. Change of Met Hb% in the blood preserved at 4℃.

○ : fresh blood, ●, □, △ : post-mortem blood.

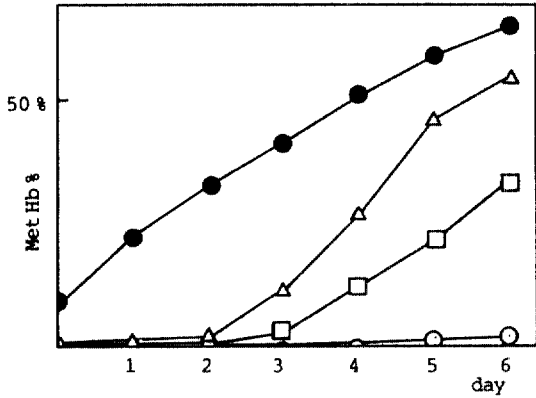


Figure 11. Change of Met Hb% in the blood preserved at room temperature.

○ : fresh blood, ●, □, △ : post-mortem blood.

2.2.2 pH의 영향

Figure 12에서 보듯이 혈액의 pH가 낮을수록 더 쉽게 Met Hb를 생성한다.²¹

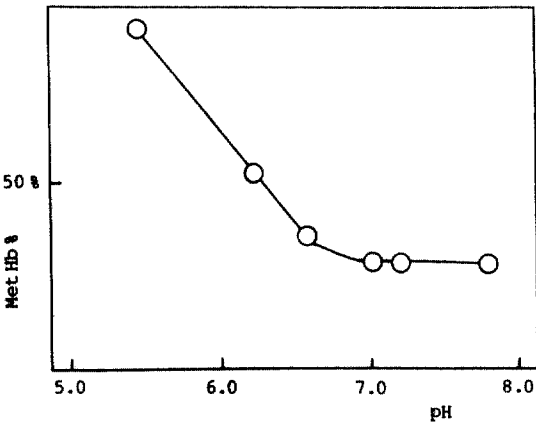


Figure 12. The effect of pH on Met Hb production in the blood of 3 rats.

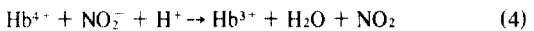
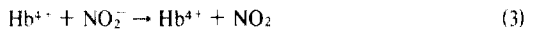
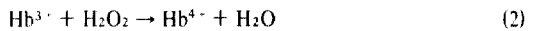
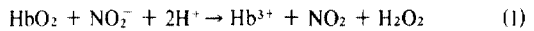
2.2.3 Methemoglobin에 의한 영향

Hemoglobin의 heme에 있는 iron은 ferrous state (Fe²⁺)이나 chemicals에 의해 산화되어 ferric state (Fe³⁺)로 된다.

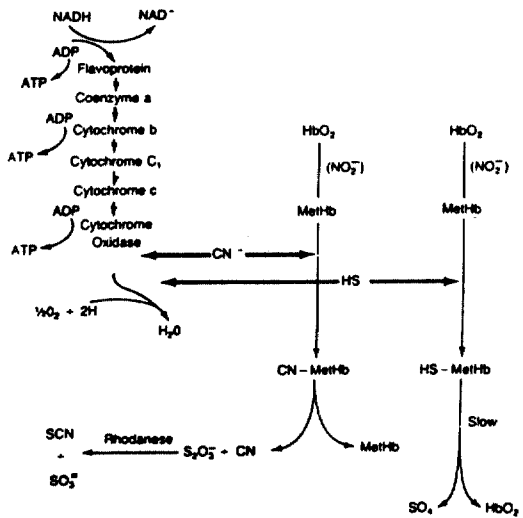
이를 Methemoglobin이라 하며, 색깔도 greenish brown에서 black으로 변하며, 이는 더 이상 산소나 일

산화탄소 등과 어떤 결합도 하지 못하며 이렇게 산화력이 있는 chemicals은 nitrites, aromatic amines, intro compounds, chlorate salt 등이 있다.

특히 nitro oxide(NO)는 hemoglobin과의 결합력이 CO의 약 1000배에 해당되며, 이는 nitrosylhemoglobin 뿐만 아니라 methemoglobin을 형성하며, nitrite에 의한 Met Hb 형성은 아래와 같다.²²



또한 Met Hb는 아래와 같이 cyanide 이온과 쉽게 반응하여 cyanmethemoglobin을 형성하며 hydrogen sulfide 이온과는 sulfmethemoglobin을 형성한다.²³



Schematic depiction of the electron transport chain through which the oxidation of NADH derived from sugar metabolism generates ATP. Both the cyanide(CN⁻) and hydrogen sulfide(HS⁻) anions bind to and inhibit cytochrome oxidase. However, both anions also bind the Fe³⁺ ion methemoglobin (Met Hb) formed by the oxidation of hemoglobin with nitrate(NO₂⁻). CN-Met Hb denotes cyanmethemoglobin; HS- Met Hb denotes sulfmethemoglobin.

3. 실험에

3.1 배기가스에 의한 질식

1990년 경기 ○○경찰서에 의뢰된 사건으로, 날씨가 흐린 날 변사자들이 맨홀 속 약 2m 깊이에 양수기를 설치하고 잠시 동안 물을 퍼낸 다음 양수기를 밖으로 꺼내기 위해 들어갔다가 사망한 사건으로 사체 혈액 중 CO Hb 농도는 Table 2와 같으며, Met Hb가 높지 않은 경우는 UV/Vis 법과 CO-oximeter법에서 CO Hb 농도에 큰 차이를 보이지 않았으며, UV/Vis spectrum은 Figure 13과 같다.

Table 2. The CO Hb conc. in poisoning blood from exhaust gas. unit:%

UV/Vis Method	CO-oximeter Method.	
	CO Hb conc.	Met Hb conc.
76.4	77.0	-0.6
70.6	72.6	3.0

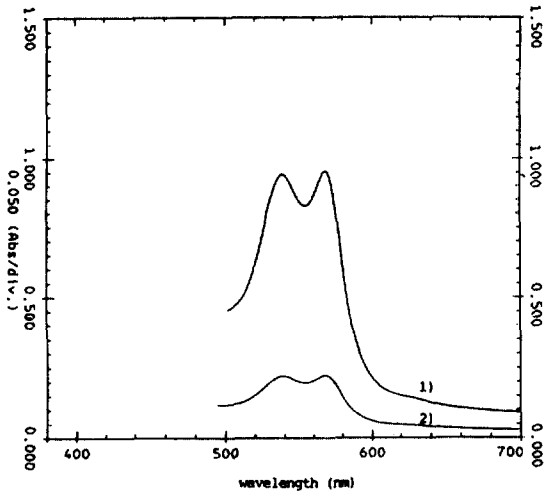


Figure 13. Spectrum of poisoned blood from exhaust gas.

3.2 소사체

1990년 경북 ○○경찰서에서 의뢰된 사건으로 70대 할머니 3명이 불에 타 숨져 있는 것을 발견 신고한 사건으로, 위 내용물, 위조직 및 혈액에서 청산염 등 독성 물질은 검출되지 않았으며, 혈액에서 LPG도 검출되지 않았으나, CO Hb 농도는 Table 3과 같이 검출되었으

며, Met Hb의 영향으로 CO-oximeter의 측정치와 UV/Vis법 측정치가 많은 차이를 보임을 알 수 있다.

Table 3. The CO Hb conc. in the blood from dead burn victims. unit:%

UV/Vis Method	CO-oximeter Method.	
	CO Hb conc.	Met Hb conc.
61.8	91.5	4.9
41.7	73.1	13.8
-	-	91.5

3.3 High Met Hb의 경우

1990년 부산 ○○경찰서에서 의뢰된 사건으로, 부친이 2세와 2개월 된 두 여아가 방에서 숨진 것을 발견, 병원으로 후송하였으나 사망한 사건으로, 위내용물 및 혈액에서 독극물 등은 검출되지 않았으며 혈액에서의 CO Hb 농도는 아래 Table 4에 나타내었고, Met Hb가 높고 CO Hb 농도가 20% 미만인 경우 UV/Vis법이 GC 법에 비해 큰 오차가 있음을 볼 수 있다.

Table 4. The CO Hb conc. in the blood with high Met Hb. unit:%

No.	UV/Vis Method	CO-oximeter Method		GC Method
	CO Hb conc.	CO Hb conc.	Met Hb conc.	CO Hb conc.
1	13	-4.7	36.0	1
2	1.2	-5.4	101.9	-

4. 결 론

CO Hb 농도의 측정은 법화학적 측면에서 매우 중요하며, 혈액의 보존은 4℃ 정도에서 보관하는 것이 CO gas의 헤리와 혈액의 부패를 감소시킬 수 있으며, 분석 방법은 Met Hb 농도가 약 10% 이하인 경우는 CO-oximeter와 UV/Vis을, Met Hb 농도가 약 10% 이상인 경우는 UV/Vis을 사용하는 것이 바람직하다.

high sulfhemoglobin과 high Met Hb를 갖는 경우와 CO Hb 농도가 약 20% 이하인 경우는 CO-oximeter법과 UV/Vis법으로 정확한 CO Hb 농도를 얻을 수 없으므로 gas chromatography를 이용하는 것이 바람직하며, 당 연구소에서는 혈액의 상태에 따라 위의 모든 방

법을 병행하여 실험을 하고 있으며, 또한 차후 정확하고 신속한 처리와 사건현장에서 사용할 수 있는 간편한 chemical sensor에 대한 연구를 수행하고 있다.

인 용 문 헌

1. E. Hodgson and p. E. Levi, A Textbook of Morden Toxicology, New York, Elsevier (1987) p.190, 331
2. R. C. Baselt, Disposition of Toxic drugs and chemicals in man. Vol 2. Connecticut (1978) p.134
3. Y. K. Hsu and Y. L. Ch'eng, *Brain*, **61**, 384 (1938)
4. R. D. Stewart, *Ann. Rev. Pharm.*, **15**, 409 (1975)
5. R. D. Stewart, E. D. Baretta and L. R. Platte et al, *J. Am. Med. Asso.*, **229**, 1187 (1974)
6. J. E. Peterson and R. D. Stewart, *Arch. Arch. Env. Health*, **21**, 165 (1970)
7. A. M. Dominguez, *J. For. Sci.*, **7**, 379 (1962)
8. C. S. Hirsch, R. O. Bost and S. R. Gerber et al, *Am. J. Clin. Path.*, **68**, 317 (1977)
9. 박성우, 김동환 등, *국과수연보*, **23**, 246 (1991)
10. 고인석, *법화학 및 실험서*, 서울, 동명사 (1970) p.184
11. Eujio Ishizawa, *Jpn. J. Legal Med.*, **35**(3), 191 (1981)
12. R. Alfred, J. Peter and S. David, *Clin. Chem.*, **20**(2), 278 (1974)
13. Toshimitsu Hayashi, *Hironobu Yamaguchi and Ryo Nanikawa*, **31**(5), 234 (1977)
14. N. W. Tietz and E. A. Fiereck, *Annals of Clinical Laboratory Science*, **3**, 36 (1973)
15. Masae Oakada, Takeo Okada and Kazumi Ide, *日法醫誌*, **39**(4), 318 (1985)
16. Keiichi Yamamoto and Yoshiko Yamamoto, *Jpn. J. Legal Med.*, **33**(6), 718 (1979)
17. Junko Shigezane, *Jpn. J. Legal Med.*, **39**(1), 1 (1985)
18. Hiromi Arimoto, *Shimadzu S. J. News*, **5**(1), 1 (1972)
19. Operator's Manual I 1 482 CO-oximeter System, *Instrumentation Laboratory, Sec.*, 1-4
20. 重實 淳子 · 北 敏郎 · 古屋 義人 *J. UOEH*, **5**(2), 265 (1983)
21. Masae Okada and Takeo Okada et al, *日法醫誌*, **40**(2), 124 (1986)
22. Hiroaki Kosaka and Hiro Tyuma, *Env. Health Perspectives*, **73**, 147 (1987)
23. P. L. Williams and J. L. Burson, *Industrial Toxicology*, New York, VNR (1985), p64
24. 박성우, 김남이 등, *국과수연보*, **23**, 273 (1991)
25. 박성우, 최영남 등, *ibid*, **21**, 190 (1989)
26. 박성우, 이광영 등, *ibid*, **22**, 185 (1990)



1968 : 중앙대학교 화학과(이학사)
 1979 : 일본과학경찰연구소 연수
 1981 : 미국서버지니아법과학연구소 연수
 1983 : 중앙대학교 화학과(이학박사)
 1972~현재 과학수사연구소 화학분석과